

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- **BLANK PAGES**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

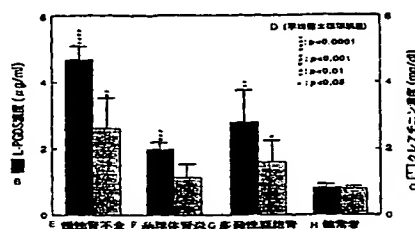
THIS PAGE BLANK (USPTO)

<p>(51) 国際特許分類6 G01N 33/573</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/14543</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月16日(16.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04804</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月3日(03.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/251450 1998年9月4日(04.09.98) JP 特願平11/133050 1999年5月13日(13.05.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) マルハ株式会社(MARUHA CORPORATION)[JP/JP] 〒100-8608 東京都千代田区大手町一丁目1-2 Tokyo, (JP) 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE)[JP/JP] 〒565-0874 大阪府吹田市古江台六丁目2-4 Osaka, (JP) 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 織田浩司(ODA, Hiroshi)[JP/JP] 清木興介(SEIKI, Kosuke)[JP/JP] 中島 浩(NAKAJIMA, Hiroshi)[JP/JP]</p>		<p>佐藤信行(SATO, Nobuyuki)[JP/JP] 〒300-4295 茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社 中央研究所内 Ibaraki, (JP) 裏出良博(URADE, Yoshihiro)[JP/JP] 〒604-8227 京都府京都市中京区西洞院通蛸薬師下ル古西町 440 藤和シティコープ706 Kyoto, (JP) 平和伸仁(HIRAWA, Nobuhito)[JP/JP] 〒233-0013 神奈川県横浜市港南区丸山台1-14-12 キャメロット上永谷409号 Kanagawa, (JP) 上原馨志夫(UEHARA, Yoshio)[JP/JP] 〒134-0087 東京都江戸川区清新町1-1-6-1906 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

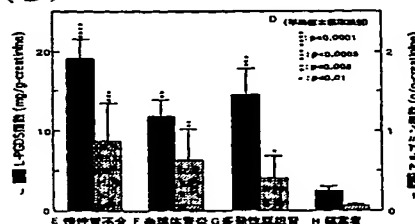
(54) Title: METHOD FOR DETECTING KIDNEY DISEASES AND PATHOLOGICAL CONTROL

(54) 発明の名称 腎疾患の検出および病態管理方法

(A)



(B)



a ... L-PGDS CONCENTRATION (pg/ml)
c ... CREATININE CONCENTRATION (mg/dl)
d ... (MEAN ± STANDARD ERROR)
e ... CHRONIC RENAL FAILURE
f ... GLOMERULONEPHRITIS
g ... MULTIPLE CYSTONEPHROSIS
h ... NORMAL SUBJECT
j ... L-PGDS INDEX (mg/g-creatinine)
k ... ALBUMIN INDEX (g/g-creatinine)

(57) Abstract

A method for detecting kidney diseases at the early stage characterized by measuring the concentration of human lipocalin-type prostaglandin D synthase in a body fluid sample collected from a subject and comparing the thus measured concentration with the human lipocalin-type prostaglandin D synthase concentration of body fluid samples obtained from healthy subjects; and a method for pathologically controlling kidney diseases characterized by measuring the concentration of human lipocalin-type prostaglandin D synthase in a body fluid sample collected from a subject and evaluating the glomerular filtration level of the patient therefrom.

(57)要約

本発明は、被験者より採取した体液試料中のヒトリボカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度を測定し、その測定値を健常者より採取した体液試料中のヒトリボカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度の測定値から設定した基準値と比較することを特徴とする、腎疾患の早期検出方法、および被験者より採取した体液試料中のヒトリボカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度を測定し、その測定値から糸球体濾過能を評価することを特徴とする、腎疾患の病態管理方法である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
HA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GE	グルジア	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GH	ガーナ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GM	ガンビア	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GW	ギニア・ビサウ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IN	インド	MW	マラウイ	US	米国
CN	中国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CU	キューバ	JP	日本	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CY	キプロス	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KR	韓国	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

明 細 書

腎疾患の検出および病態管理方法

技術分野

本発明は、腎疾患の検出方法、詳しくは、既存の診断法では検出できない早期の腎疾患を検出することのできる腎疾患の早期検出方法、および糸球体濾過能を簡便に評価することによる腎疾患の病態管理方法である。

背景技術

近年、糖尿病性腎症のために透析療法に入る患者の数が年々増加している。平成8年の統計では、1年間に新たに透析導入された糖尿病性腎症患者数は9,351名で、第一位の慢性腎炎の10,995名に極めて近い数字に増加してきている（関川 暁ら，第41回日本糖尿病学会学術集会）。しかし、残念なことに、糖尿病患者の透析療法は、心不全、血圧の動揺、感染症、シャントトラブルなど多くの問題があり、透析導入後の平均余命は3年程度と短いのが現状である（例えば、日本透析療学会統計調査委員会，透析会誌，25，1095-1103，1992参照）。従って、糖尿病性腎症では早期診断による早期治療が重要であると考えられている。

糖尿病性腎症や糸球体腎炎をはじめとした腎糸球体に病変を起こす腎疾患の診断、病態管理において、イヌリン、クレアチニンなどを対象としたクリアランス試験は、糸球体濾過能を評価する上で有用であるとされている。しかし、クリアランス試験では蓄尿が必要となり、またイヌリン等の外因性物質の投与によるクリアランス試験では外因性物質の静脈注射が必要となるため、試験に要する時間や煩雑さの面からその適用は明らかな腎疾患患者に限られていた。従って、腎疾患が疑われる、あるいは可能性のある患者の日常的な診断法としてクリアランス試験が用いられることは少なく、持続性蛋白尿の検出や血中クレアチニン濃度の測定によって診断が行われるケースが多かった。ところが、持続性蛋白尿の出現する時期や血中クレアチニン濃度の上昇する時期には、既に非可逆性の糸球体病変が進行していることも知られている（例えば、「腎臓学」，黒川清編，249-251頁，（1995）参照）。従って、持続性タンパク尿の検出や血中クレアチニン濃度

の測定は、病変の初期段階を有効に検出できる手段とはなり得ない。

近年、尿中に排泄される種々の蛋白質の測定が可能となり、例えば糖尿病性腎症においては尿中へのアルブミンの増加、即ち、微量アルブミン尿が持続性蛋白尿に先行することが明らかとなった。そこで現時点では、微量アルブミン尿などの出現をもって腎疾患を診断することが一般化している。

糖尿病性腎症およびそれ以外の腎症の病期分類としては、一般的には、第1期（腎症前期）、第2期（早期腎症期）、第3期（顕性腎症期）、第4期（腎不全期）、第5期（透析療法期）に分類される（繁田幸男ら，平成3年度糖尿病調査研究報告書，厚生省，317-320，1992）。微量アルブミン尿を呈する時期は、上記のうち第2期（早期腎症期）に該当し、病理学的にはこの時期には既に軽度から中等度のびまん性病変が存在し、結節性病変の存在も知られている。例えば糖尿病性腎症においては、腎糸球体基底膜の肥厚およびメサンギウム領域の拡大が特徴とされているが、臨床的に微量アルブミン尿の認められない時期より、これらの変化が既に存在することも知られている（猪股茂樹ら，糖尿病，30，429-435，1987、Bangstad, H., J. et al., Diabetologia, 36, 523-529, 1993）。従って、第2期（早期腎症期）は必ずしも初期腎症とは限らず、あくまでも現在の臨床検査で診断可能な時期と解されている。これに対し、微量アルブミン尿を呈する以前の第1期（腎症前期）に生ずる異常については事実上腎生検でしか検出できないと考えられる。しかしながら、腎生検は侵襲的であるが故、苦痛や危険性を伴い、また検査開始から結果が出るまでに多大な手間や時間がかかる。よって、このような微量アルブミン尿を呈する以前の異常を、非侵襲的に検出できる簡便な検査法の開発が望まれるところである。

このような状況下、尿中IV型コラーゲンが腎症前期においても増加することが報告され、糖尿病性腎症のより早期の指標となり得る可能性が示された（Hayashi, Y. et al., Diabetic Medicine, 9, 366-370, 1992、Yagame, M. et al., J. Clin. Lab. Anal., 11, 110-116, 1997）。このような尿中IV型コラーゲンの増加は、腎糸球体基底膜の肥厚およびメサンギウム基質の増生、拡大などの組織的变化を反映して、糸球体基底膜、糸球体上皮細胞、或いは尿細管上皮細胞においてその産生が亢進することが原因であると考えられている（磯野元秀ら，糖尿

病, 39, 599-604, 1996)。しかしながら、このような腎糸球体における組織的変化が生じてしまう以前にも、腎糸球体組織内の細胞レベルでは、糖尿病に特徴的な高血糖に対応して、代謝や形態など様々な変化が生じているものと考えられる。例えば、糖尿病ラット糸球体、高糖濃度条件下で培養した糸球体、メサンギウム細胞などでプロテインキナーゼC活性の亢進が報告されており、糖尿病性腎症をはじめとした糖尿病合併症における組織的変化との関連が注目されている (Craven, P., A. and DeRubertis, F. R., J. Clin. Invest., 83, 1667-1675, 1989、Williams, B. and Schrier, R. W., Diabetes, 41, 1464-1472, 1992)。従って、このような細胞レベルの質的な変化をより早期に検出できれば、組織的変化が生じてしまう以前により効果的な対処が取れるものと考えられるが、これまでのところ臨床的にそのような有用性を検討した報告はない。

一方、ヒトリボカリン型プロスタグランジンD合成酵素(以下L-PGDS)は、各種プロスタグランジン類の共通の前駆体であるPGH₂から、睡眠誘発作用をはじめとした各種生理作用を示すPGD₂への異性化を触媒する酵素である(Urade, Y., Fujimoto, N., and Hayaishi, O., J. Biol. Chem., 260, 12410-12415, 1985、Urade, Y., Watanabe, K., and Hayaishi, O., J. Lipid Mediator Cell Signaling, 12, 257-273, 1995)。近年、このL-PGDSが、ヒト脳脊髄液(CSF)中に多量に存在することが知られていた β -トレースと同一であることが明らかにされた(Hoffmann, A., Conradt, H. S., Gross, G., Nimitz, M., Lottspeich, F., and Wurster, U., J. Neurochem., 61, 451-456, 1993、Zahn, M., Mader, M., Schmidt, B., Bollensen, E., and Felgenhauer, K., Neurosci. Lett., 154, 93-95, 1993、Watanabe, K., Urade, Y., Mader, M., Murphy, C., and Hayaishi, O., Biochem. Biophys. Res. Commun., 203, 1110-1116, 1994)。

L-PGDSがまだ β -トレースと呼ばれていた1969年に、Ericssonらは腎疾患と β -トレース(L-PGDS)の関連性を示唆する論文を発表している(Ericsson, J., Link, H., and Zettervall, O., Neurology, 19, 606-610, 1969)。即ち、当時の測定法は技術的に未熟であったため、健常者の血中および尿中ではL-PGDSが検出できなかったが、血中クレアチニン濃度およびクレアチニークリアランスに異常が認められる慢性腎炎をはじめとする腎疾患患者の血中および尿中ではL-PGDSが

検出され、これら患者でその濃度が上昇することが示唆された。また、Felgenhauerらも、健常者では検出されない血中L-PGDSが、1例のみであるが腎不全患者において検出されたと報告している（Felgenhauer, K., Schadlich, H. J., and Nekic, M., Klin. Wochenschr., 65, 764-768, 1987）。これに対して、Whitsedらは、より高感度の測定法を開発し、健常者とタンパク尿を呈する腎疾患患者の尿中L-PGDS濃度（24時間当たりの排泄量）を比較したが、腎疾患患者が必ずしも高濃度のL-PGDSを示すとは限らないとの報告を行っている（Whitsed, H., and Penny, R., Clin. Chim. Acta, 50, 111-118, 1974）。このように、研究者によって腎疾患とL-PGDSの相関性について意見が分かれているのは、これらの報告で用いている測定法がポリクローナル抗体を用いた古典的な免疫学的方法に基づく半定量的なものであるためであると考えられる。最近、ドイツのHoffmannらは、より定量性の高い測定系を用いて、末期腎不全である透析療法期の患者の血中L-PGDS濃度が、健常者と比べ著しく上昇していること確認した（Hoffmann, A., Nimtz, M., and Conradt, H. S., Glycobiology, 7, 499-506, 1997）。しかしながら、彼らの測定法では特異性を明らかにしたモノクローナル抗体を用いているものの、血液試料からL-PGDSを精製した後、ウェスタンブロッティングを行い、バンドの濃さを比較するという煩雑な方法であるため、小さな濃度差を正確に比較することはやはり困難であると考えられる。

このように、これまでに行われてきた腎疾患とL-PGDS（ β -トレース）の相関性に関する検討は、何れも、クレアチニンの動態に異常を示す、タンパク尿を呈する、透析療法期である、といったように、既存の検査手段で腎疾患が明らかに進展していることを確認した患者を対象にして、L-PGDSの著しい濃度上昇を検出したに過ぎない。これに対し、腎疾患が進展する以前のL-PGDS濃度に関する検討はこれまで全くなされていなかった。

発明の開示

本発明の課題は、これまでの腎疾患に対する種々の検査手段では検出することのできなかつた早期腎症期以前に生ずる腎異常を、正確に且つ被験者の負担が少なく検出することのできる方法を提供することにある。更に、これまで時間や手

間のかかるクリアランス試験によって評価していた糸球体濾過能を、簡便且つ短時間に評価することのできる方法を提供することにある。

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、血液、尿等の体液中L-PGDS濃度を測定し、その測定値を指標とすることより、疾患がある程度進展した早期腎症期以前の腎疾患を発見することができることを見出し、更に、その測定値を指標にすることにより、腎疾患患者の病態管理を行えることを見出し、本研究を完成させるに至った。

即ち、本発明は、被験者より採取した体液試料中のL-PGDSを測定し、その測定値を健常者より採取した体液試料中のL-PGDS濃度の測定値から設定した基準値と比較することを特徴とする、腎疾患の早期検出方法である。

本発明はまた、被験者より採取した体液試料中のL-PGDS濃度を測定し、その測定値から糸球体濾過能を評価することを特徴とする、腎疾患の病態管理方法である。

以下本発明を詳細に説明する。

本発明において、L-PGDSを測定する試料は、被験者から採取した体液であり、具体的には、血液、尿（随時尿、蓄尿等）、羊水等が挙げられる。

上記試料中のL-PGDS濃度を測定する方法としては、L-PGDS濃度を正確に反映する測定法であれば特に限定はされず、例えば免疫学的測定法、酵素活性測定法が挙げられる。しかしながら、実際の臨床現場において、簡便に且つ多量の試料を同時に測定する必要性の観点から、L-PGDSに特異的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いたEIA、ELISA、RIA、FIA等の免疫学的測定法によるのが好適である。

上記の免疫学的測定法のうち、特に、L-PGDS特異的モノクローナル抗体を使用したサンドイッチELISA法が好ましく、該モノクローナル抗体としては、具体的には、ハイブリドーマ細胞株1B7（FERM BP-5709）、7F5（FERM BP-5711）、6F5（FERM BP-5710）、9A6（FERM BP-5712）、10A3（FERM BP-5713）より産生される抗体が挙げられる。

サンドイッチELISA法による測定に際しては、既に本発明者らにより確立され

ている、上記モノクローナル抗体を含むL-PGDS検出キットを利用すればよい（WO 97/16461）。

本発明においては、上記手段で測定されたL-PGDS濃度測定値を指標として腎疾患を早期に検出し、また当該測定値から糸球体濾過能を評価することによって、腎疾患の病態を管理することができる。

本発明の方法では、上記手段で測定した被験者の体液試料中のL-PGDS濃度測定値を健常者の体液試料中のL-PGDS濃度より設定した基準値と比較することにより、腎疾患を検出する。

ここで「基準値」とは、陽性・陰性を判定するための値をいい、臨床現場ではカットオフ値とも呼ばれる。この基準値は、例えば「健常者の平均値」＋（ $\alpha \times$ 標準偏差）により設定することができる。ここで、 α は0.5, 1, 2, 5などであり、正規分布をとる集団では2が用いられるケースが多い。

腎疾患の検出は、具体的には、まず健常者からなる集団を対象としてその体液試料中のL-PGDS濃度を測定して上記式より基準値を設定し、次に、被験者の体液試料中のL-PGDS濃度の測定値が、基準値以上の値を示した（異常値を示した）場合に陽性と判定することによって行う。

また、腎疾患の病態を管理するには、上記手段で測定した被験者の体液試料中のL-PGDS濃度測定値から糸球体濾過能を評価することによって行う。

本発明において、病態の管理とは、病状（重篤度の程度）の把握、予後の観察をいう。

本発明の方法により検出され、または病態の管理が行える腎疾患としては、例えば、糸球体病変を伴うもの、高血圧性腎障害、脂質代謝異常性障害などが挙げられ、具体的には腎症など、さらに具体的には、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、多発性嚢胞腎、または腎不全などが挙げられる。ここで、糖尿病性腎症には、例えば微量アルブミン尿を呈する時期以前や尿中IV型コラーゲンの増加が見られる以前の極めて初期の糖尿病性腎症も含まれる。

図面の簡単な説明

図1は、血中L-PGDS濃度と血中クレアチニン濃度の相関性を示す。

図 2 は、尿中L-PGDS指数と尿中アルブミン指数の相関性を示す。

図 3 は、尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数の相関性を示す。

図 4 は、各種腎疾患患者における血中L-PGDS濃度と血中クレアチニン濃度（A）、および尿中L-PGDS指数と尿中アルブミン指数（B）を示す。

図 5 は、血中L-PGDS濃度・血中クレアチニン濃度と糖尿病歴の相関性（A）、および尿中L-PGDS指数・尿中アルブミン指数と糖尿病歴の相関性（B）を示す。

図 6 は、血中L-PGDS濃度とクレアチニンクリアランスの相関性（A）、および尿中L-PGDS指数とクレアチニンクリアランスの相関性（B）を示す。

図 7 は、尿中アルブミン指数を基に分類した各アルブミン尿期における、尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数の変化を示す。

図 8 は、尿中アルブミン指数を基に分類した各アルブミン尿期における、尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数の陽性率を示す。

図 9 は、尿中IV型コラーゲン指数陽性・陰性の糖尿病患者における、尿中L-PGDS指数の陽性率を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

〔参考例〕（健常者の血中および尿中L-PGDS濃度の測定と基準値の設定）

健常者から採取した血液（血清）および随時尿について、これら体液試料におけるL-PGDS濃度を2抗体サンドイッチELISA法により測定し、基準値の設定を行った。

（1）標準曲線の作成

まず、L-PGDSと結合可能な抗L-PGDSモノクローナル抗体（クローン：7F5）を50mM炭酸緩衝液（pH 9.6）に4.4 μ g/mlになるように希釈し、96ウエルマイクロタイタープレートに300 μ l/ウエルずつ加えて、4℃で一晩放置し固相化した。このプレートをリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.4、以下PBS）で3回洗浄した後、0.2%カゼインを含むPBS（pH 7.4、以下ブロッキング液）を300 μ l/ウエル加えて30℃で

90分インキュベートし、ブロッキングを行った。

次いで、ブロッキング後のプレートに0.05%Tween20を含むPBS (T-PBS) で3回洗浄した後、100 μ lの標準L-PGDS溶液 (CSFより純化したL-PGDSをブロッキング液で段階希釈することにより調製) を各ウェルに加え、30°Cで90分間インキュベートした。反応後、T-PBSで3回洗浄し、ブロッキング液で0.5 μ g/mlになるように希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化抗PGDSモノクローナル抗体 (クローン: 1B7) 100 μ lを各ウェルに加え、30°Cで90分間インキュベートした。T-PBSで3回洗浄した後、発色液 (ABTS solution: ベーリンガー・マンハイム社製) 100 μ lを各ウェルに加え、30°Cで30分間インキュベートした後、停止液 (1.5%シュウ酸) を100 μ lずつウェルに加え、プレートミキサーで攪拌して反応を停止させた。市販のプレートリーダー (型番SK601、生化学工業社製) により405nmと490nmにおける吸光度の差 ($A_{405nm} - A_{490nm}$) を測定し、標準曲線を作成した。

上記サンドイッチELISA法に用いたモノクローナル抗体 (クローン: 1B7、7F5) は、マウス腹腔内にプリスタン1.0mlを注射し、その後2週間目にそれぞれの抗体産生細胞株を 1×10^8 個マウスの腹腔内に移植し、2週間後に腹水を採取し、得られた腹水をプロテインAアフィニティーカラムクロマトグラフィー操作にかけることにより得た (3~10mg/ml)。

尚、上記モノクローナル抗体を産生する細胞株はそれぞれ上記モノクローナル抗体名に一致し、それぞれの細胞株は、工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、1B7についてはFERM BP-5709 (原寄託日平成7年9月21日)、7F5についてはFERM BP-5711 (原寄託日平成8年6月6日) として寄託されている。

(2) 試料中のL-PGDS濃度の測定

血液は192例、随時尿は56例を用い、それぞれブロッキング液で適宜希釈して、上記のサンドイッチELISA法に従ってL-PGDS濃度を測定した。測定の結果、健常者によって得られた平均値 \pm 標準偏差は、血中では $0.848 \pm 0.186 \mu$ g/mlであった。随時尿を用いた検討では、採尿時の尿の濃さの違いによる影響を考慮して、尿中クレアチニン濃度による換算を行い、尿中L-PGDS指数 (L-PGDS/g-creatinine) として表すこととした。その結果、健常者によって得られた尿中L-PGDS指数

の平均値±標準偏差は、 $2.44 \pm 1.86 \text{ mg/g-creatinine}$ であった。このようにして得られた平均値±標準偏差から前記式に従い、平均値+ ($2 \times$ 標準偏差) で基準値を設定したところ、血中で $1.22 \mu\text{g/ml}$ 、尿中で $6.16 \text{ mg/g-creatinine}$ という値が得られた。

以下の各実施例において、体液試料（血液、尿）中のL-PGDSの測定は参考例の方法に従い、クレアチニンの測定はアルカリピクリン酸法、尿中アルブミンの測定はラテックス凝集法、尿中IV型コラーゲンの測定はサンドイッチELISA 法によって行った。また、尿試料は随時尿を用いたため、濃度差を考慮して、尿中クレアチニンによる換算を行った（尿中L-PGDS指数： $\text{L-PGDS/g-creatinine}$ 、尿中アルブミン指数： $\text{アルブミン/g-creatinine}$ 、尿中IV型コラーゲン指数： $\text{IV型コラーゲン/g-creatinine}$ ）。

〔実施例1〕（L-PGDSと血中クレアチニン、尿中アルブミン、および尿中IV型コラーゲンとの相関性）

内科外来患者118名を対象として、血中L-PGDS濃度、血中クレアチニン濃度、尿中L-PGDS指数、尿中アルブミン指数をそれぞれ測定した。また、内科外来患者284名を対象として、尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数を測定した。

図1～3にそれぞれ示されるように、血中L-PGDS濃度と血中クレアチニン濃度、尿中L-PGDS指数と尿中アルブミン指数、および尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数は、いずれも高い相関性を示した。従って、L-PGDSは、これまでの血中クレアチン、尿中アルブミン、尿中IV型コラーゲンに匹敵する腎疾患診断の指標となり得ることが明らかとなった。

〔実施例2〕（各種腎疾患患者におけるL-PGDS濃度の変化）

腎疾患患者42名（慢性腎不全：11名、糸球体腎炎：23名、多発性嚢胞腎：8名）を対象として、血中L-PGDS濃度および尿中L-PGDS指数の測定を行った。同時に血液試料に関しては血中クレアチニン濃度を、尿試料に関しては尿中アルブミン指数を測定した。結果を図4に示す。

図4に示されるように、全ての腎疾患において血中L-PGDS濃度および尿中L-PG

DS指数が健常者に対し有意に増加することが明らかとなった。また、血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数も上昇したが、p 値（危険率）を比較すると、L-PGDSの方がより小さい値を示した。従って、L-PGDSは血中クレアチニン、尿中アルブミンよりも優れた腎疾患診断の指標となり得るといえる。

〔実施例 3〕（糖尿病患者におけるL-PGDS濃度の変化）

糖尿病患者55名を対象として、血中L-PGDS濃度および尿中L-PGDS指数の測定を行った。同時に血液試料に関しては血中クレアチニン濃度を、尿試料に関しては尿中アルブミン指数を測定した。患者を糖尿病歴によって分類した（5 年未満：22名、5 年以上10年未満：19名、10年以上：14名）結果を図 5 に示す。

図 5 に示されるように、血中L-PGDS濃度および尿中L-PGDS指数はともに病歴が長くなるに従って上昇することが判明した。また、血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数も病歴が長くなるほどに上昇したが、p 値（危険率）を比較すると、L-PGDSの方がより小さい値を示した。糖尿病では腎症を合併しやすいことから、L-PGDSは血中クレアチニン、尿中アルブミンよりも優れた腎症移行の指標となり得るといえる。

〔実施例 4〕（糖尿病患者における追跡調査）

実施例 3 において、血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数とも正常値を示したが、血中L-PGDS濃度および／または尿中L-PGDS指数に異常値を示した患者 6 名に関して、2 年間の追跡調査を行った。尚、L-PGDSの異常値は、健常者の平均値 + (2 × 標準偏差)（血中：1.22 μ g/ml、尿中：6.16mg/g-creatinine）以上、血中クレアチニン濃度の異常値は1.1mg/dl以上、尿中アルブミン指数の異常値は30mg/g-creatinine以上とした。結果を表 1 に示す。

表 1

糖尿病患者における追跡調査

	被験者 1	被験者 2	被験者 3	被験者 4	被験者 5	被験者 6
(試験開始時)						
血中クレアチン 濃度(mg/dl)	0.9	1.0	0.8	0.7	0.9	0.7
尿中アルブミン 指数(mg/g-creatinine)	15.9	28.8	15.2	19.4	8.8	10.1
血中L-PGDS濃度 (μ g/ml)	1.86 *	1.69 *	1.25 *	1.06	0.70	0.94
尿中L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	13.66*	12.21*	5.79	14.94*	7.05 *	9.80 *
(2年後)						
血中クレアチン 濃度(mg/dl)	1.3 *	5.5 *	3.4 *	0.6	1.1 *	0.7
尿中アルブミン 指数(mg/g-creatinine)	64.9 *	373.8*	269.0 *	29.1	103.2 *	8.8
血中L-PGDS濃度 (μ g/ml)	2.03 *	6.91 *	1.73 *	1.14	1.37 *	1.12
尿中L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	14.60*	17.57*	19.59*	5.10	7.75 *	6.72 *

* 異常値

表 1 に示されるように、試験開始時には 6 名全員が血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数とも正常値を示したが、2 年後には 6 名中 4 名で血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数ともに異常値を示し、腎症を併発していることが明らかとなった。このことは、現在の臨床診断で検出不可能な極めて初期の腎症を、L-PGDS濃度測定によって検出することが可能であることを示しており、その濃度測定値が健常者の平均値 + (2 × 標準偏差) 以上を示す者を陽性と判断することが適していることが明らかとなった。

〔実施例 5〕 (内科外来患者における追跡調査)

実施例 1 において、血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数はともに正常値を示したが、血中L-PGDS濃度および／または尿中L-PGDS指数が異常値を示した患者 8 名に関して、2 年間の追跡調査を行った。尚、L-PGDS濃度の異常値は健常者の平均値 + (2 × 標準偏差) (血中: 1.22μ g/ml、尿中: 6.16 mg/g-creatinine) 以上、血中クレアチニン濃度の異常値は 1.1 mg/dl以上、尿中アルブミン指数の異常値は 30 mg/g-creatinine以上とした。結果を表 2 に示す。

表 2

内科外来患者における追跡調査

	被験者 1	被験者 2	被験者 3	被験者 4	被験者 5	被験者 6	被験者 7	被験者 8
〔試験開始時〕								
血中クレアチン 濃度(mg/dl)	0.7	0.9	1.0	0.7	0.7	0.8	0.6	0.6
尿中アルブミン 指数(mg/g-creatinine)	9.5	10.0	22.1	12.3	5.8	20.5	15.9	8.8
血中L-PGDS濃度 (μg/ml)	2.03 *	1.68 *	1.88 *	1.39 *	0.89	0.79	1.20	1.03
尿中L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	16.51 *	8.87 *	15.55 *	5.44	6.74 *	11.94 *	14.58 *	7.62 *
〔2年後〕								
血中クレアチン 濃度(mg/dl)	1.2 *	0.8	3.2 *	2.7 *	1.2 *	1.3 *	0.9	0.7
尿中アルブミン 指数(mg/g-creatinine)	47.2 *	9.5	523.3 *	633.7 *	349.0 *	98.5 *	14.0	7.0
血中L-PGDS濃度 (μg/ml)	1.38 *	1.16	2.08 *	3.21 *	1.61 *	1.23 *	1.07	0.93
尿中L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	7.93 *	9.27 *	16.52 *	22.74 *	9.60 *	17.77 *	13.41 *	5.72

* 異常値

表 2 に示されるように、試験開始時には 8 名全員が血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数ともに正常値を示していたが、2 年後には 8 名中 5 名で血中クレアチニン濃度、尿中アルブミン指数ともに異常値を示し、腎疾患を発症していることが明らかとなった。このことは、現在の臨床診断で検出不可能な極めて初期の腎疾患を、L-PGDS濃度測定によって検出することが可能であることを示しており、その濃度測定値が健常者の平均値 + (2 × 標準偏差) 以上を示す者を陽性と判断することが適していることが明らかとなった。

〔実施例 6〕（糸球体病変の病態管理）

糸球体腎炎患者および慢性腎不全患者 11 名を対象として、24 時間クレアチニンクリアランスと血中L-PGDS濃度および尿中L-PGDS指数の測定を行った。尚、尿中L-PGDS指数の測定には随時尿を用いた。結果を図 6 に示す。

図 6 に示されるように、血中L-PGDS濃度および尿中L-PGDS指数は、共にクレアチニンクリアランスと高い相関性を示し、L-PGDS濃度測定は糸球体濾過能の評価に有用であることが明らかとなった。L-PGDSの測定には蓄尿や外因性クリアランス物質の投与が必要でないため、本法により糸球体病変の病態管理を簡便に行う

ことが可能となった。

〔実施例 7〕（糖尿病性腎症の進行とL-PGDS濃度）

糖尿病患者101名を対象として、尿中L-PGDS指数の測定を行った。同時に尿中アルブミン指数および尿中IV型コラーゲン指数も測定した。尿中アルブミン指数より糖尿病性腎症の進行程度を、正常アルブミン尿期（尿中アルブミン指数：30 mg/g-creatinine未満、57名）、微量アルブミン尿期（同：30mg/g-creatinine以上300mg/g-creatinine未満、27名）、顕性タンパク尿期（同：300mg/g-creatinine以上、17名）に分類した結果を図7に示す。

図7に示されるように、尿中L-PGDS指数および尿中IV型コラーゲン指数は共に糖尿病性腎症の進行に伴って増加してくることが明らかとなった。従って、尿中L-PGDSは、尿中アルブミンまたは尿中IV型コラーゲンに匹敵する早期糖尿病性腎症の指標となり得るといえる。

更に、正常アルブミン尿期の糖尿病患者の尿中L-PGDS指数は健常者より有意に高かったが、尿中IV型コラーゲン指数ではこのような有意差が認められないことが判明した。このことは、尿中アルブミンや尿中IV型コラーゲンの測定では検出できない極めて初期の糖尿病性腎症が、尿中L-PGDSの測定では検出可能であることを示している。

〔実施例 8〕（糖尿病性腎症の進行と陽性率）

実施例7で分類した各アルブミン尿期の患者における、尿中L-PGDS指数および尿中IV型コラーゲン指数の陽性率を調べた。尿中L-PGDS指数の異常値は、実施例5に従い、6.16mg/g-creatinine以上とした。また、尿中IV型コラーゲン指数の異常値は、磯野らの基準に従い、3.7 μ g/g-creatinine以上とした（磯野元秀ら，糖尿病，39，599-604，1996）。各々、異常値を示した場合を陽性と判定した結果を図8に示す。

図8に示されるように、顕性タンパク尿期の患者では、尿中L-PGDS指数と尿中IV型コラーゲン指数は共に100%陽性を示した。しかし微量アルブミン尿期の患者では、尿中L-PGDS指数の陽性率が尿中IV型コラーゲン指数の陽性率を僅かに上回

っていた（74.1% vs 70.4%）。更に正常アルブミン尿期の患者では、尿中L-PGDS指数の陽性率は尿中IV型コラーゲン指数の陽性率を大きく上回っていた（57.9% vs 36.8%）。

更に、これら糖尿病患者101名を尿中IV型コラーゲン指数の基準値で2群に分類し、陽性群・陰性群における尿中L-PGDS指数の陽性率を検討した結果を図9に示す。

図9に示されるように、尿中IV型コラーゲン指数陽性症例では尿中L-PGDS指数も90%以上が陽性と判定され、両者の結果はほぼ一致した。一方、尿中IV型コラーゲン指数が陰性でも、尿中L-PGDS指数が陽性と判定された症例が40%存在していた。

以上の結果は、尿中アルブミンまたは尿中IV型コラーゲンの測定では検出できない極めて初期の糖尿病性腎症が、尿中L-PGDSの測定では検出可能であることを示している。

〔実施例9〕（糖尿病患者における後ろ向き調査）

実施例7の被験者の内、尿を2～3年前に採取し、-20℃にて保存していた63名を対象として、保存尿中のL-PGDS、アルブミン、IV型コラーゲン指数を測定した。尿中アルブミン指数の異常値は、日本糖尿病学会・日本腎臓学会の合同委員会の診断基準に従い、30mg/g-creatinine以上とした。また、尿中L-PGDSおよびIV型コラーゲン指数の異常値は、実施例8と同様とした。

その結果、保存検体における尿中アルブミン指数および尿中IV型コラーゲン指数とも正常値を示したが、尿中L-PGDS指数のみ陽性と判定される患者が8名存在することが明らかとなった。これら8名について、以前（2～3年前）および現在の尿中L-PGDS、アルブミン、IV型コラーゲン指数をまとめたものを表3に示す

表 3

糖尿病患者における後ろ向き調査

	被験者 1	被験者 2	被験者 3	被験者 4	被験者 5	被験者 6	被験者 7	被験者 8
〔以前〕								
7A7ミ 指数(mg/g-creatinine)	9.6	10.9	2.3	18.9	6.7	0.6	8.8	5.7
IV型コラーゲン 指数 (μ g/g-creatinine)	2.6	1.5	1.2	2.2	1.1	2.7	3.0	3.5
L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	6.60 *	9.68 *	10.34 *	9.08 *	6.43 *	7.89 *	7.09 *	6.79 *
〔現在〕								
7A7ミ 指数(mg/g-creatinine)	55.3 *	234.4 *	51.1 *	12.3	39.5 *	31.0 *	9.9	31.8 *
IV型コラーゲン 指数 (μ g/g-creatinine)	9.1 *	22.8 *	7.3 *	11.6 *	2.6	10.0 *	3.7 *	3.8 *
L-PGDS指数(mg/g-creatinine)	9.41 *	16.12 *	13.44 *	8.12 *	6.28 *	16.29 *	4.93	10.21 *

* 異常値

以前～現在の尿中L-PGDS指数を見ると、正常値になった者は1名のみであり（被験者7）、残りの7名は依然として異常値を示していた。これら7名の内、2～3年間で更に尿中アルブミン指数のみが異常値を示すようになった者が1名（被験者5）、尿中IV型コラーゲン指数のみが異常値を示すようになった者が2名（被験者4、7）存在した。加えて、尿中アルブミン指数および尿中IV型コラーゲン指数が共に異常値を示すようになった者は5名存在した（被験者1、2、3、6、8）。

これらのことは、尿中L-PGDSの測定によって、尿中アルブミンや尿中IV型コラーゲンの測定では検出できない極めて初期の糖尿病性腎症を検出することが可能であることを示している。

産業上の利用可能性

本発明によれば、糸球体腎炎、糖尿病性腎症などの腎糸球体に病変を有する腎疾患の指標として現在用いられている血中クレアチニンや尿中アルブミンよりも

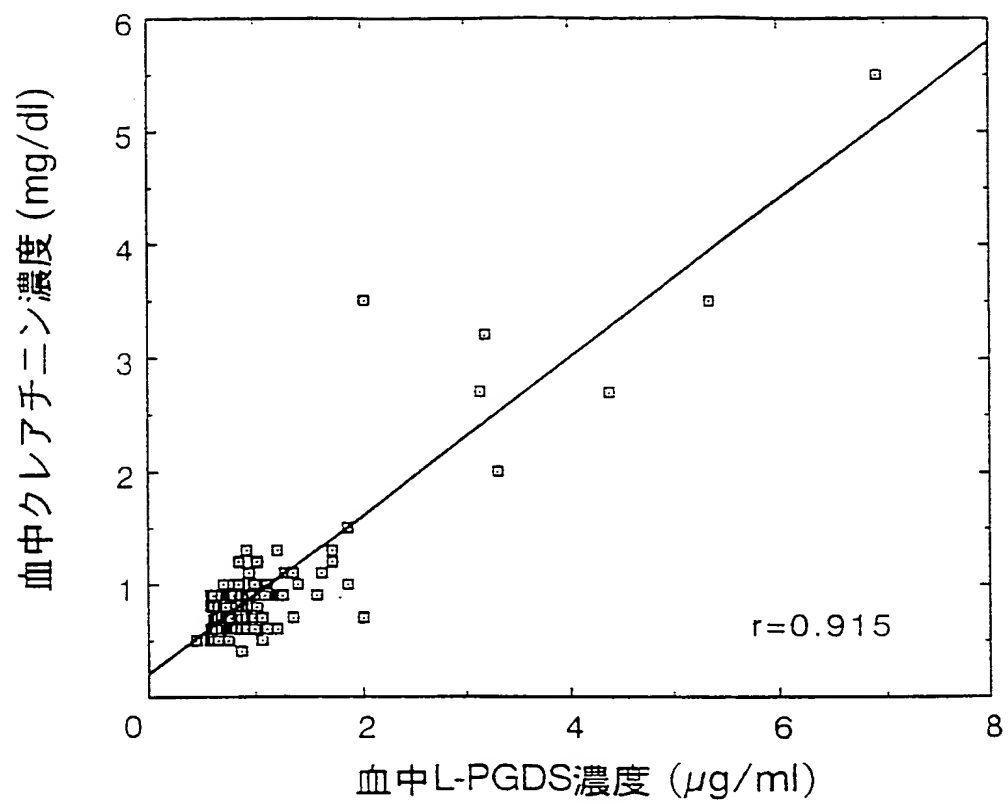
顕著に腎異常を検出することのできる方法が提供される。しかも、本発明方法は、血中クレアチニン、尿中アルブミン、尿中IV型コラーゲンで異常を示さない、現在の臨床診断で検出不可能な早期腎症期以前の腎疾患をも、極めて正確に且つ被験者の負担を少なく検出できる。更に、本発明方法により、蓄尿や外因性クリアランス物質の投与を必要とせず、糸球体濾過能の評価を簡便に行うことができる。従って、本発明方法は、腎疾患の早期発見と、患者の病態管理に極めて有用である。

請 求 の 範 囲

1. 被験者より採取した体液試料中のヒトリボカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度を測定し、その測定値を健常者より採取した体液試料中のヒトリボカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度の測定値から設定した基準値と比較することを特徴とする、腎疾患の早期検出方法。
2. 被験者より採取した体液試料中のヒトリボカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度を測定し、その測定値から糸球体濾過能を評価することを特徴とする、腎疾患の病態管理方法。
3. 体液試料中のヒトリボカリン型プロスタグランジンD合成酵素濃度の測定を、免疫学的測定法により行うことを特徴とする、請求項1～2のいずれかに記載の方法。
4. 腎疾患が糸球体病変を伴うものである、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
5. 腎疾患が高血圧性腎障害、または脂質代謝異常性腎障害である、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
6. 腎疾患が腎症である、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
7. 腎疾患が糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、多発性嚢胞腎、または腎不全である、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

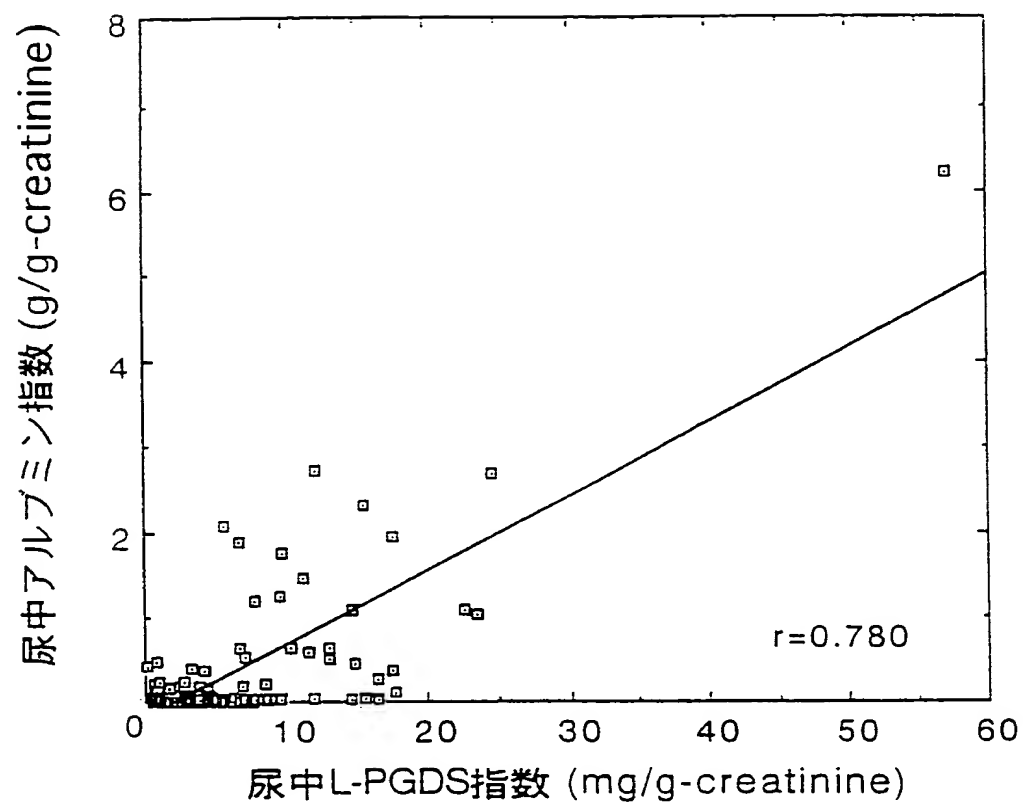
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1



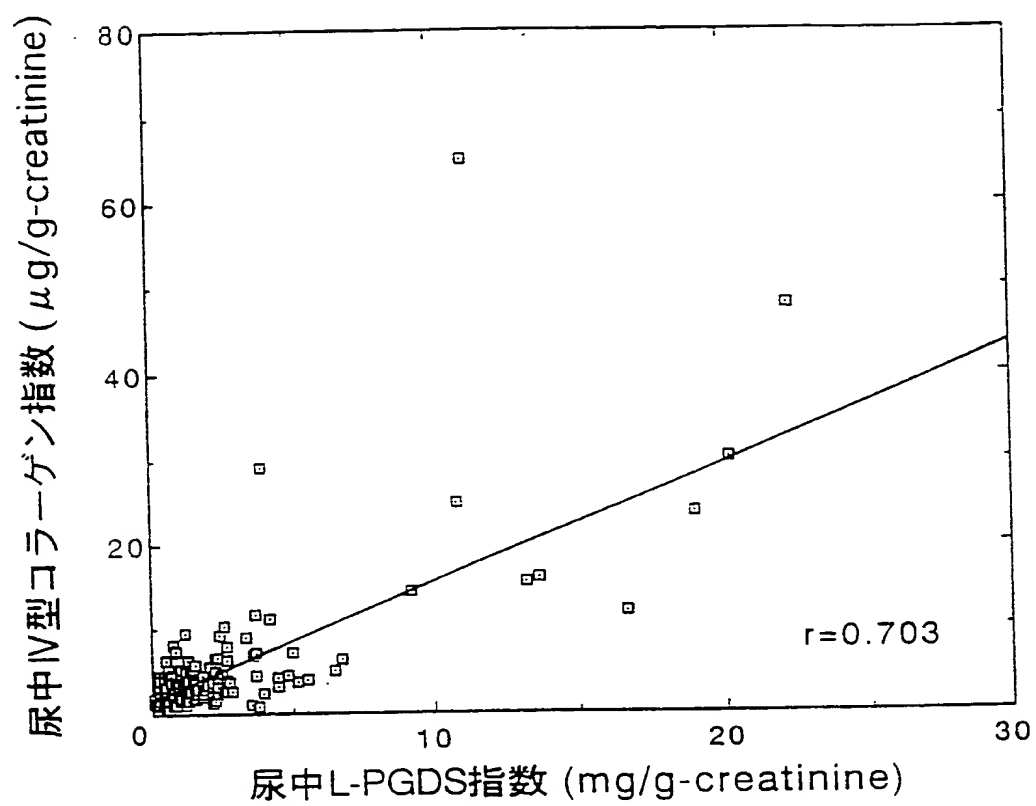
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 4 (A)

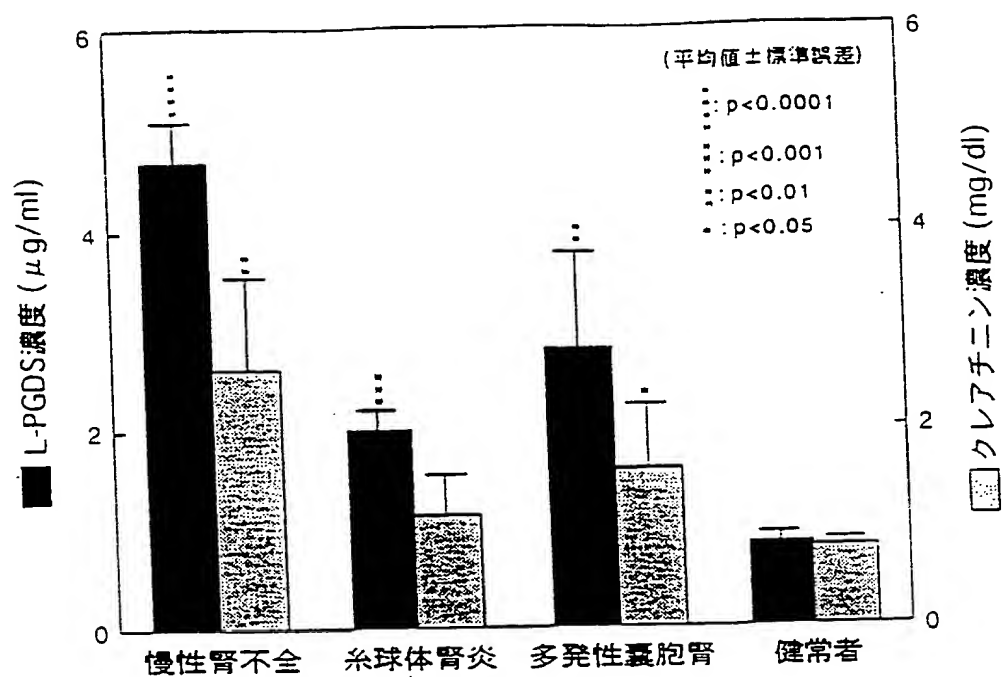
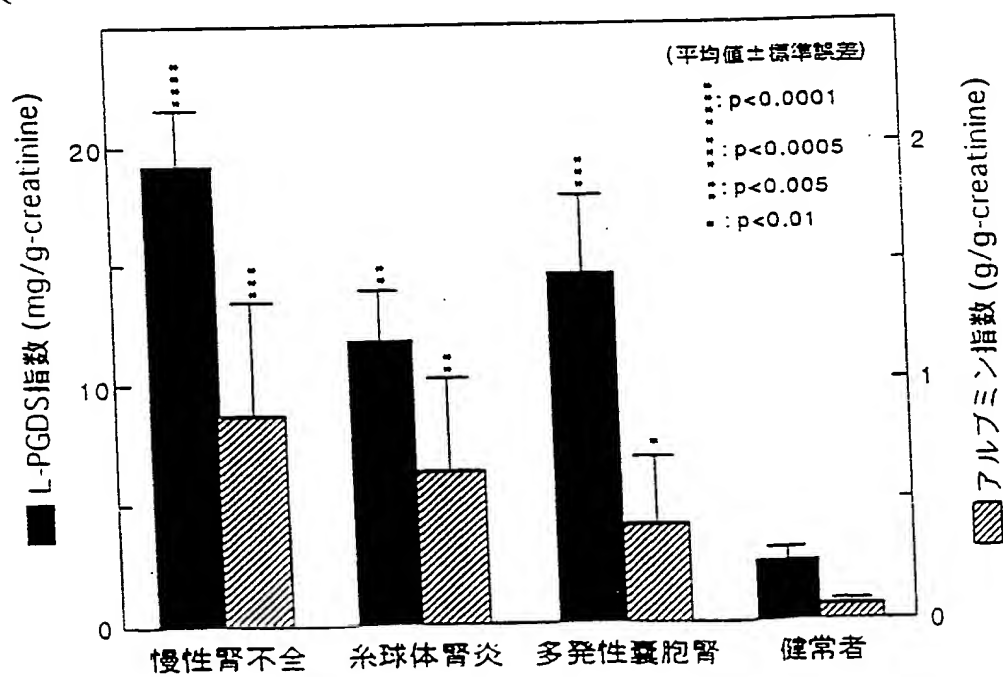


図 4 (B)



THIS PAGE BLANK (00. 10.)

図 5 (A)

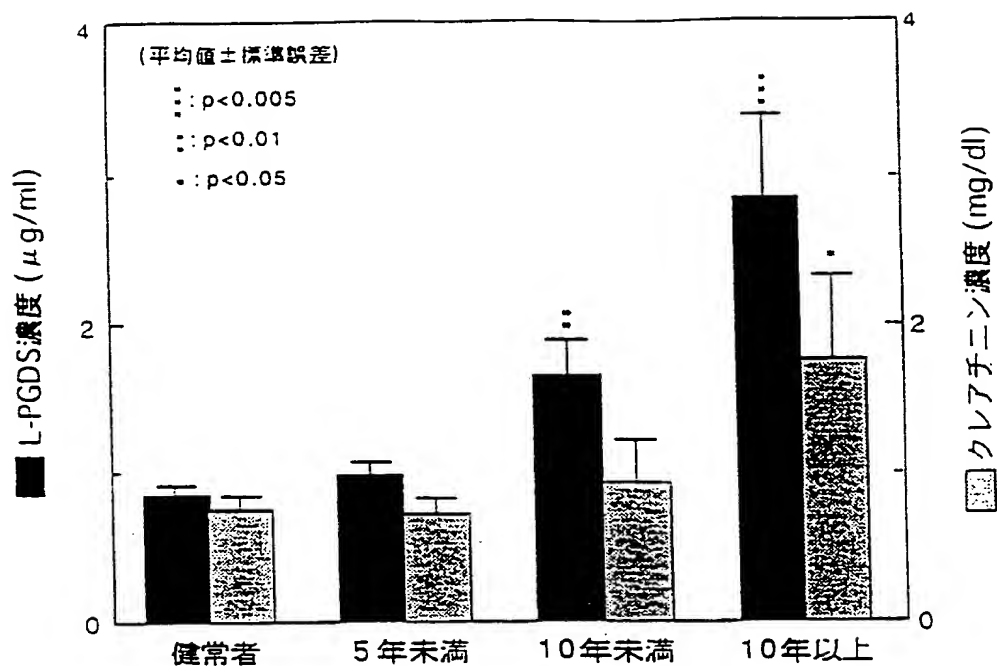
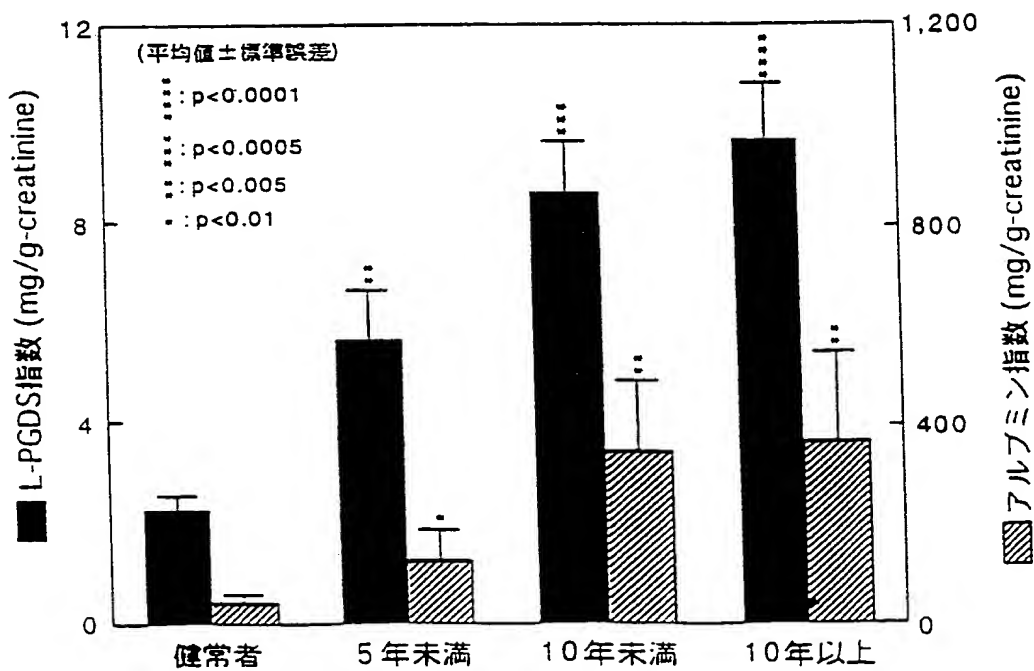


図 5 (B)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 6 (A)

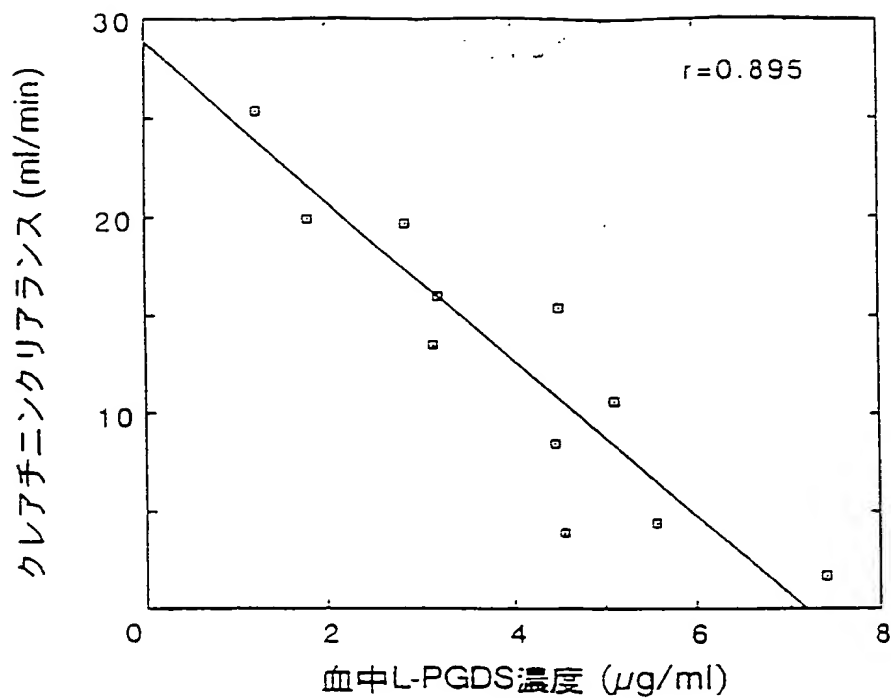
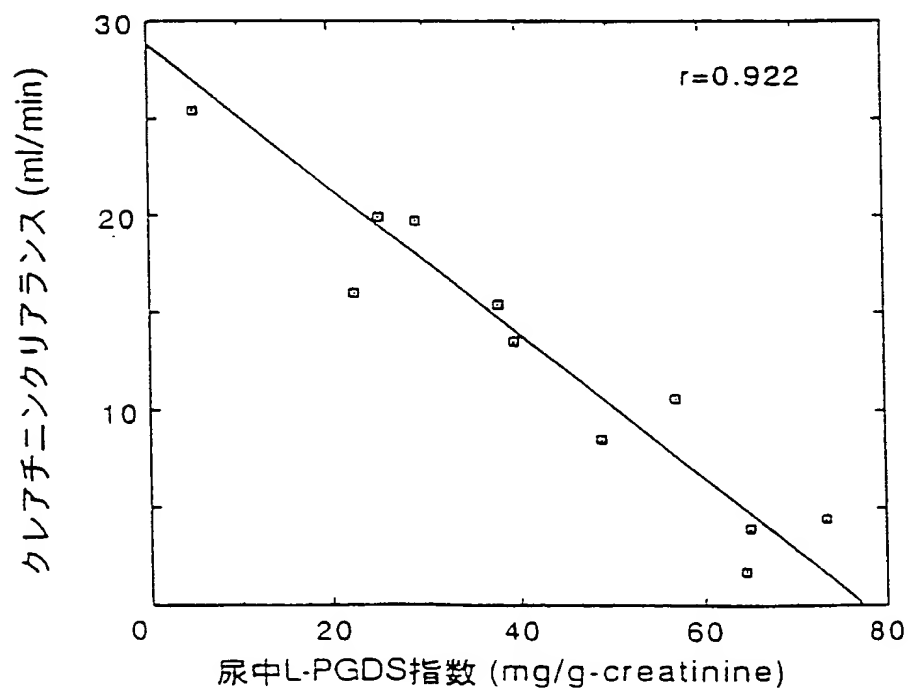
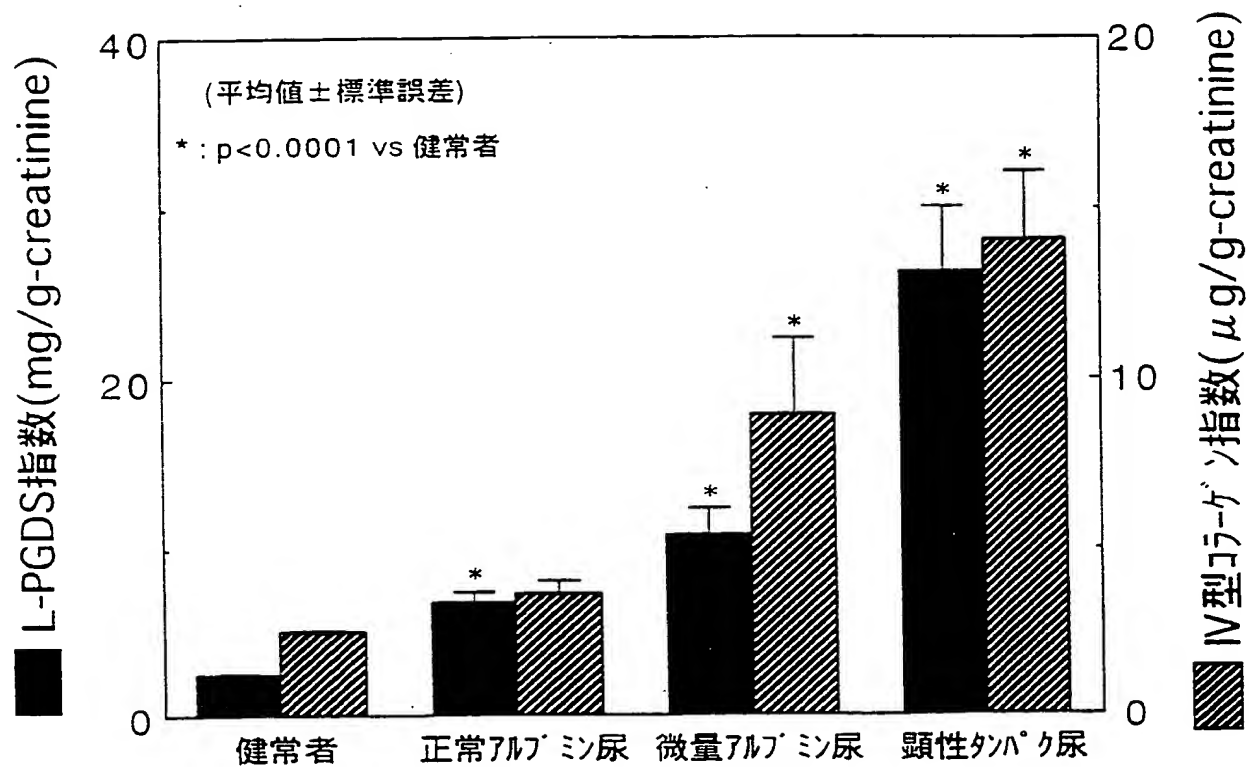


図 6 (B)



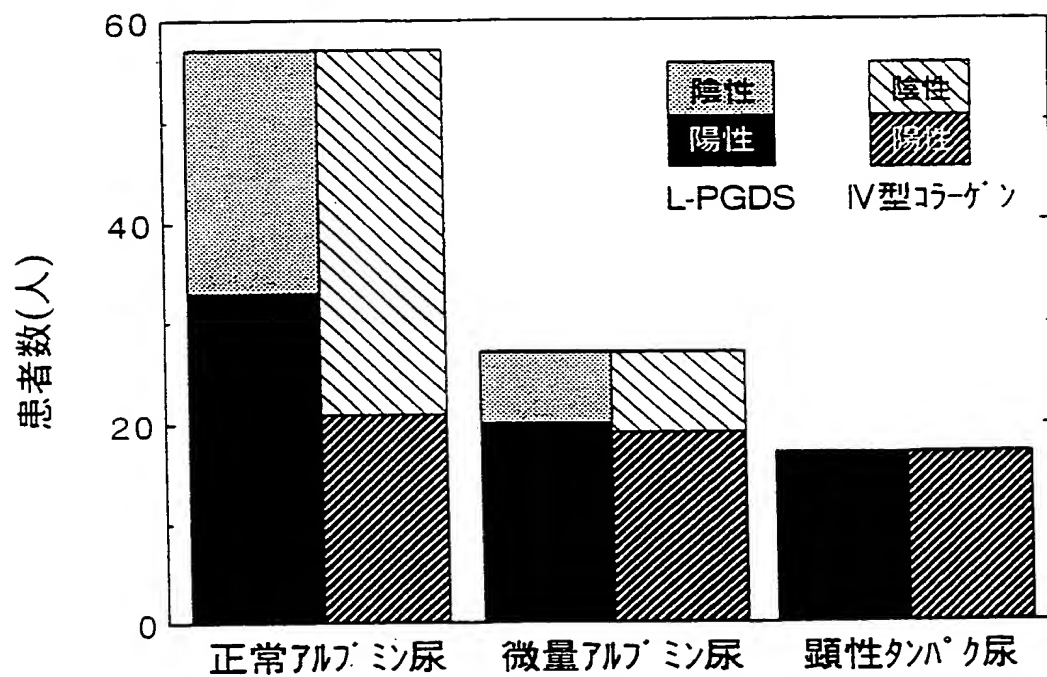
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 7



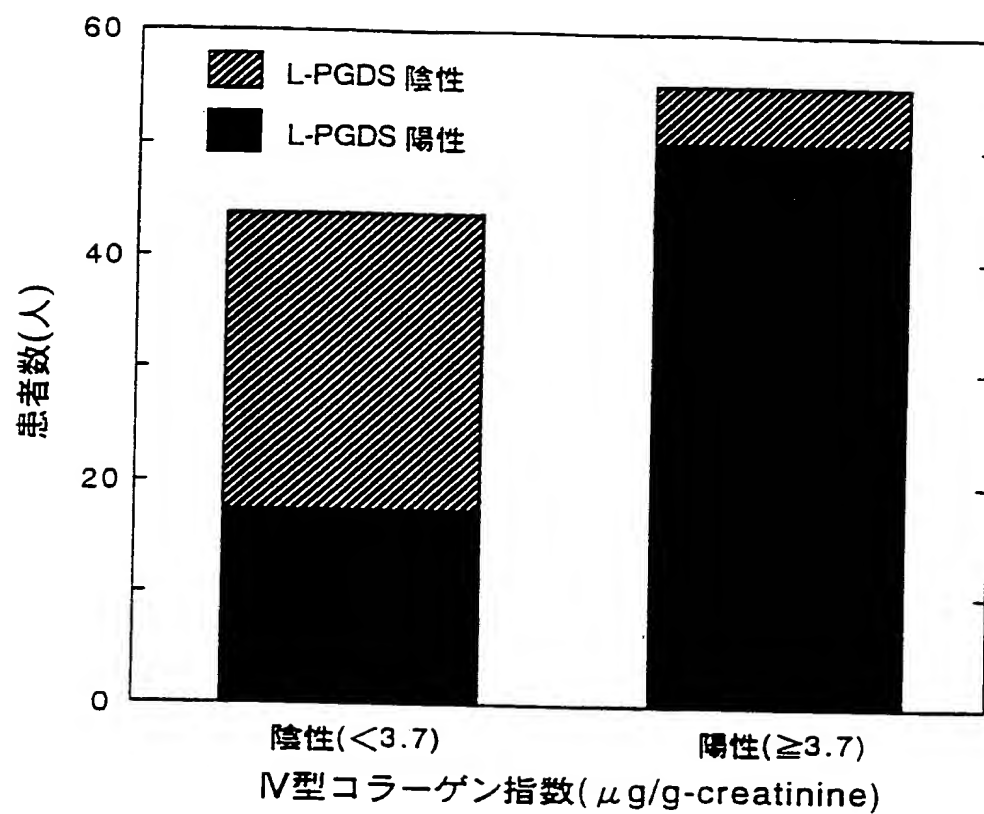
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 9



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.

PCT/JP99/04804

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁶ G01N33/573

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ G01N33/573

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS [(Lipocalin type prostaglandin + beta trace protein) *
(kidney + renal)]

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Andrea H., "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF β -TRACE PROTEIN IN HUMAN SERUM AND URINE: A POTENTIAL DIAGNOSTIC MARKER FOR RENAL DISEASES", GLYCOBIOLOGY, VOL. 7, NO. 4, p.499-506, (1997)	1-7
Y	WO, 97/16461, A1 (Maruha Corp.), 9 May, 1997 (09. 05. 97) & EP, 913405, A	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 September, 1999 (16. 09. 99)

Date of mailing of the international search report
28 September, 1999 (28. 09. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04804

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁸ G 01 N 33/573

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁸ G 01 N 33/573

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-1999年
日本国登録実用新案公報	1994-1999年
日本国実用新案登録公報	1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

B I O S I S 【 (Lipocalin type prostaglandin + beta trace protein) * (kidney + renal) 】

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Andrea H., "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF β -TRACE PROTEIN IN HUMAN SERUM AND URINE: A POTENTIAL DIAGNOSTIC MARKER FOR RENAL DISEASES", GLYCOBIOLOGY, VOL. 7, NO. 4, p. 499-506, (1997)	1~7
Y	WO, 97/16461, A1 (マルハ株式会社) 9. 5月. 1997 (09. 05. 97) & EP, 913405, A	1~7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 09. 99

国際調査報告の発送日

28.09.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

印

2 J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3252